

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.3.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 4 月 3 0 日
Date of Application:

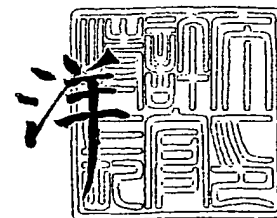
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 3 6 2 2 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 1 3 6 2 2 8]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所
 学校法人近畿大学
 財団法人北九州産業学術推進機構

2 0 0 5 年 2 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004002581
【提出日】 平成16年 4月30日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫殿
【国際特許分類】 C12N 15/11
【発明者】
 【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術
 総合研究所九州センター内
 【氏名】 大庭 英樹
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡県飯塚市柏の森11-6 近畿大学産業理工学部内
 【氏名】 藤井 政幸
【特許出願人】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
【特許出願人】
 【識別番号】 000125347
 【氏名又は名称】 学校法人近畿大学
 【代表者】 世耕 弘昭
【特許出願人】
 【識別番号】 802000031
 【氏名又は名称】 財団法人北九州産業学術推進機構
 【代表者】 有馬 朗人
【代理人】
 【識別番号】 100071825
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 阿形 明
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 033547
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリングエンド或はその両方に化学修飾塩基が導入されていることを特徴とするコンジュゲート型siRNA。

【請求項2】

センス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方が、非末端位置において化学修飾塩基を含むことを特徴とするコンジュゲート型siRNA。

【請求項3】

化学修飾塩基がポリアミン分子を結合したものである請求項1又は2記載のコンジュゲート型siRNA。

【請求項4】

2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリングエンド或はその両方に、二官能性リンカーを介して、核外移行シグナルペプチド又は膜融合ペプチドを導入したものであることを特徴とするコンジュゲート型siRNA。

【請求項5】

センス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方が、非末端位置において、二官能性リンカーを介して、核外移行シグナルペプチド又は膜融合ペプチドを導入したものであることを特徴とするコンジュゲート型siRNA。

【請求項6】

二官能性リンカーが、二価の化学修飾塩基残基である請求項4又は5記載のコンジュゲート型siRNA。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規なコンジュゲート型 s i R N A

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素耐性が強化され、細胞中で酵素により分解されにくい新規 s i R N A 及び細胞への導入が可能で細胞質に局在化し得る高活性の新規 s i R N A に関するものである。

【背景技術】

【0002】

R N A 干渉はアンチセンス R N A やリボザイムに比べて遥かに強い遺伝子発現制御力を示すことから、遺伝子医薬や遺伝子機能解明のツールとしての期待が高まっている。

しかしながら、s i R N A は細胞への導入が困難な上に、細胞中での分解酵素耐性が低く安定した効果が得られないため、実用化することができない。

【0003】

一方、遺伝子医薬については、細胞内の細胞核よりも細胞質において、より高い効力を発揮することが知られているので、その細胞質における遺伝子医薬の局在化を実現することが可能であれば、優れた遺伝子医薬が得られることになるが、これまでこのような遺伝子医薬は知られていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、このような事情のもとで、酵素耐性を高め、細胞中において酵素により分解されず、また細胞質内に局在化して高い活性を示し、遺伝子医薬として好適に利用し得る新規な s i R N A を提供することを目的としてなされたものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは s i R N A について、その細胞中への導入を可能にし、かつ細胞中での酵素耐性を高め、あるいは細胞質への局在化を可能にするために種々研究を重ねた結果、s i R N A に陽イオン性又は脂溶性を付与しうる化学修飾塩基を導入することにより、細胞中への導入を可能にし、かつ細胞中での酵素耐性を高め得ること、及びこの化学修飾塩基を介して核外移行シグナルペプチド（以下 N E S ペプチドと略記する）を結合すれば、細胞質に局在化させることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0006】

すなわち、本発明は、2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリリングエンド或はその両方に化学修飾塩基が導入されていることを特徴とするコンジュゲート型 s i R N A、及び2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリリングエンド或はその両方に、二官能性リンカーを介して、核外移行シグナルペプチド又は膜融合ペプチドを導入したものであることを特徴とするコンジュゲート型 s i R N A を提供するものである。

ここで、ダングリリングエンドとは、2本鎖を構成するアンチセンス鎖のアンチ鎖と非相補的部分、すなわち1本鎖部分を意味する。

【0007】

本発明のコンジュゲート型 s i R N A は、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリリングエンド或はその両方に化学修飾塩基が導入されている。

【0008】

このようなものとしては、例えば、式

5' - 配列表配列番号 1 - 3'

で表わされるセンス鎖と、式

5'-配列表配列番号2-3'

で表わされるアンチセンス鎖とから構成されるコンジュゲート型 siRNA において、センス鎖の5'末端のみに化学修飾塩基が導入されたもの、アンチセンス鎖の5'末端のみに化学修飾塩基が導入されたもの、センス鎖の5'末端とアンチセンス鎖の5'末端の両方に化学修飾塩基が導入されたもの、式

5'-配列表配列番号1-3'

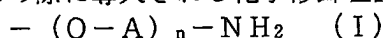
で表わされるセンス鎖と、式

5'-配列表配列番号2-3'

で表わされるアンチセンス鎖とから構成されるコンジュゲート型 siRNA において、センス鎖の5'末端とアンチセンス鎖のダンダリングエンドの両方に化学修飾塩基が導入されたもの、及びアンチセンス鎖のダンダリングエンドのみに化学修飾塩基が導入されたものを挙げるができる。

【0009】

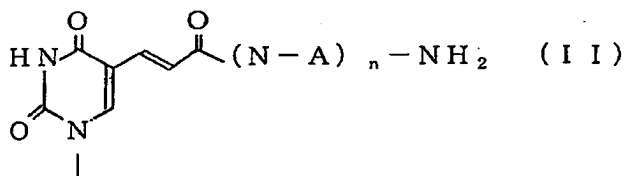
この際に導入される化学修飾塩基としては、例えば一般式



(式中のAはアルキレン基、nは1以上の整数である)

で表わされるアルキレングリコール又はポリアルキレングリコールとヒドロキシアルキルアミンとのエーテル残基や、一般式

【化1】



(式中のA及びnは前記と同じ)

で表わされる環状有機塩基をもつカルボン酸アミドのアルキレンジアミン付加物残基などの水溶性を付加し得る基を挙げるができる。

これらの中で特に好ましいのは、Aがエチレン基でnが1又は2の化合物である。

【0010】

次に、センス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方が非末端位置において化学修飾塩基を含むコンジュゲート型 siRNA としては、例えば式

5'-配列表配列番号1-3'

で表わされるセンス鎖と、式

5'-配列表配列番号2-3'

で表わされるアンチセンス鎖とから構成されるコンジュゲート型 siRNA において、センス鎖の3'末端から2番目のtのみが化学修飾塩基に置き換ったもの、アンチセンス鎖のダンダリングエンドすなわち3'末端から2番目のtのみが化学修飾塩基に置き換ったもの、センス鎖の3'末端から2番目のtとアンチセンス鎖のダンダリングエンドすなわち3'末端から2番目のtがそれぞれ化学修飾塩基に置き換ったもの、センス鎖の5'末端から6番目と15番目のuとが化学修飾塩基に置き換ったもの、アンチセンス鎖の3'末端から5番目、7番目、10番目及び15番目のuが化学修飾塩基に置き換ったもの、センス鎖の5'末端から6番目と15番目のuとアンチセンス鎖の3'末端から5番目、7番目、10番目及び15番目のuが化学修飾塩基に置き換ったものなどが挙げられる。

【0011】

これらのセンス鎖やアンチセンス鎖の塩基数やその結合順序には特に制限はなく、これまで知られている siRNA 構造の中から任意に選ぶことができる。また、化学修飾塩基の構造についても特に制限はなく、その大きさ、官能基の種類など任意に選ぶことができる。

【0012】

このようにして、化学修飾塩基が導入された siRNA は、細胞中での酵素耐性が強化され、しかも細胞毒性は認められない。

【0013】

一方、本発明においては、オリゴヌクレオチドに NES ペプチドや膜融合ペプチドをコンジュゲートさせることにより、細胞への導入が可能で、細胞中で酵素に分解されず、かつ細胞質に局在化させることができる高活性 siRNA を得ることができる。

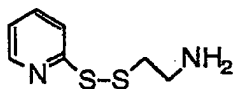
この NES ペプチドや膜融合ペプチドの導入は、二官能性リンカーを介して行われるが、この二官能性リンカーとしては、活性水素含有基と反応して安定な結合を形成し得る官能基 2 個を有する化合物が用いられる。

【0014】

このような化合物としては、例えば以下の (イ) ないし (チ) に示す化合物が挙げられる。

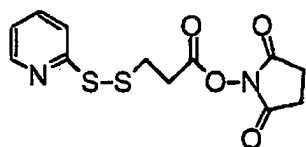
(イ) S - (2 - ピリジルジチオ) システアミン

【化2】



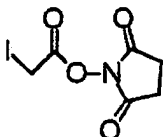
(ロ) N - スクシンイミジル = 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピナート

【化3】

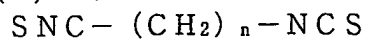


(ハ) ヨードアセトキシスクシンイミド

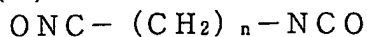
【化4】



(ニ) ジチオイソシアナトアルカン



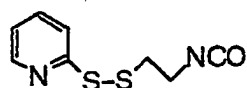
(ホ) ジイソシアナトアルカン



(ただし n は 1 ~ 10 の整数)

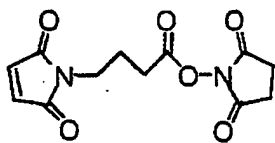
(ヘ) 2 - (2 - ピリジルジチオ) エチルイソシアネート

【化5】



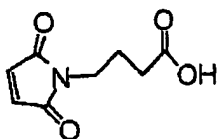
(ト) N - (4 - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド

【化6】



(チ) N-4-マレイミド酪酸

【化7】



【0015】

この二官能性リンカーを介して siRNA に導入される NES ペプチドとしては、例えば HIV-1 Rev (配列表配列番号3)、PKI α (配列表配列番号4)、MAPK K (配列表配列番号5)、Dsk-1 (配列表配列番号6)、TFIIIA (配列表配列番号7) などが挙げられるが、それ以外の NES ペプチドも用いることができる。

【0016】

また、NES ペプチド以外のペプチドとしては、HIV-1 tat C-テルミナス (terminus) 膜融合ペプチド (配列表配列番号8)、gp-41 膜融合ペプチド (配列表配列番号9)、SV40 T アンティゲン (antigen) 核局在化シグナル (配列表配列番号10)、HIV-1 タート (tat) 核局在化シグナル (配列表配列番号11)、両親媒性人工デザインペプチド α -ヘリックス (配列表配列番号12)、両親媒性人工デザインペプチド β -シート (配列表配列番号13)、両親媒性人工デザインペプチド β -シート (配列表配列番号14)、両親媒性人工デザインペプチド β -シート (配列表配列番号15) などがある。

【0017】

さらに、スベルミン、スベルミジン、グルコサミン、ガラクトサミンのようなポリアミンを導入することもできる。このようなポリアミンを導入すると、細胞中における酵素耐性が向上する。

【0018】

二官能性リンカーを介して siRNA に上記のペプチド又はポリアミンを導入するには、先ず siRNA のセンス鎖又はアンチセンス鎖に二官能性リンカーを反応させる。これは、固相フラグメント縮合法に従い、先ず多孔性ガラス、制御多孔性ガラス (CPG)、ポリエチレングリコール/ポリスチレンのような固相担体上にセンス鎖又はアンチセンス鎖を縮合し、その活性水素含有基、例えばアミノ基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基と二官能性リンカーとを反応させる。

【0019】

この際の溶媒としては、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシドのような極性溶媒が好ましい。この際の反応温度は10~40℃、反応時間は反応させる二官能性リンカーの種類、ペプチド又はポリアミンの種類、反応温度などにより変わるが、だいたい2~10時間である。また、溶媒中の二官能性リンカーの濃度としては、0.1~1モル/リットルが適当である。反応終了後、同じ溶媒でよく洗浄し、不純物を除去する。

【0020】

次に、このようにして得た siRNA のセンス鎖又はアンチセンス鎖と二官能性リンカーとの縮合生成物を固相担体上に担持したまま、これにペプチド又はポリアミンを有機溶剤、例えばアセトニトリルやジメチルホルムアミドなどに溶解して加え、10~40℃において2~10時間かきまぜることによって反応させる。反応終了後、同じ溶剤で洗浄し

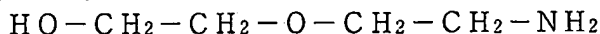
、不純物を除くと固相担体に結合した siRNA が得られる。

次いで、アルカリで処理し固相担体から脱離させ、クロマトグラフなどにより精製すれば、所望のコンジュゲート型 siRNA が 2～50% の収率で得られる。

この際用いるアルカリとしては、濃アンモニア水又は 0.5 M 炭酸ナトリウム水溶液が好ましい。

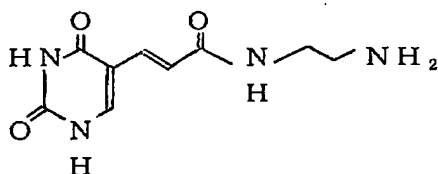
【0021】

また、二官能性リンカーとしては、特に前記した一般式 (I) 又は (II) で表わされる化学修飾塩基を導入し得る化合物を用いるのが好ましい。このような化合物としては、例えば式



で表わされるアミン及び

【化8】

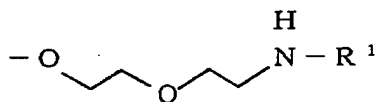


で表わされるアミンがある。

【0022】

このような二官能性リンカーをセンス鎖又はアンチセンス鎖と反応させたのち、各種ペプチド、ポリアミンと反応させると、一般式

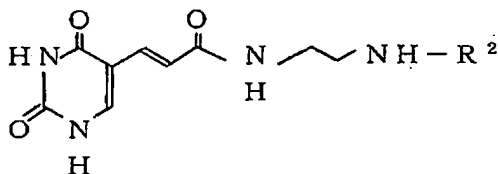
【化9】



(ただし、 R^1 は NES ペプチド、膜融合ペプチド、核局在化シグナルペプチドなどのペプチド又はスベルミン、スベルミジン、グルコサミン、ガラクトサミン、トリス (2-アミノエチル) アミン、トリエチレンテトラミンなどのポリアミンである)

又は一般式

【化10】



(ただし、 R^2 はスベルミン、スベルミジン、グルコサミン、ガラクトサミンなどのポリアミンである)

で表わされる化学修飾塩基が導入される。

【0023】

本発明のコンジュゲート型 siRNA は、以上のようにして製造した化学修飾塩基が導入されたセンス鎖又はアンチセンス鎖あるいはその両方を用いて、常法に従って 2 本鎖を形成させることによって得ることができる。

【0024】

この 2 本鎖の形成は、未修飾のセンス鎖と化学修飾塩基が導入されたアンチセンス鎖、化学修飾塩基が導入されたアンチセンス鎖と未修飾のアンチセンス鎖、あるいは化学修飾塩基が導入されたセンス鎖と化学修飾塩基が導入されたアンチセンス鎖とを、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシドなどの極性

有機溶媒中に溶解し、1～10時間かきまぜることによって行うことができる。この際、所望ならば反応を促進するために高めた温度、例えば30～60℃に加熱することもできる。

このようにして得られるコンジュゲート型 siRNA は、常法に従い、逆相高速液体クロマトグラフィーなどを用いて精製する。

【発明の効果】

【0025】

本発明によると、容易に細胞導入することができ、細胞中で酵素により分解されることがなく、また細胞質に局在化する新規な高活性 siRNA が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

次に、実施例により本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれによってなんら限定されるものではない。

【0027】

製造例 1

DNA/RNA 自動合成機（クアアケム社製、製品名「PS250」）を用い、制御多孔性ガラス（以下CPGという）上で、常法に従って固相法により、RNAのセンス鎖（5'-配列表配列番号1-3'）（以下RNA₁という）又はアンチセンス鎖（5'-配列表配列番号2-3'）（以下RNA₂という）の5'末端をアミノ化試薬（グレン・リサーチ社製、製品名「5'-アミノモディファイア5」）で化学修飾した。

【0028】

次いで、得られた反応生成物に28%濃度のアンモニア水を加え、50℃において6時間かきまぜることにより、固相担体からの化学修飾物の切り出しと同時に、保護基の脱離を行ったのち、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。得られた化学修飾RNAは質量分析（MALDI TOF-MS）により同定した。このようにして、次に示す末端が化学修飾されたRNA 2種を製造した。

RNA₃ 5'-配列表配列番号16-3'（センス）

RNA₄ 5'-配列表配列番号17-3'（アンチセンス）

ただし、塩基配列中のn=-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂NH₂

このようにして得たRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

【0029】

製造例 2

中間位置置換用のアミノ試薬（グレン・リサーチ社製、製品名「アミノモディファイアC₂dT」）を用い、製造例1と同様にして塩基配列中の非末端位置にあるt又はuをXに置換した次に示すRNA 4種を製造した。

RNA₅ 5'-配列表配列番号18-3'（センス）

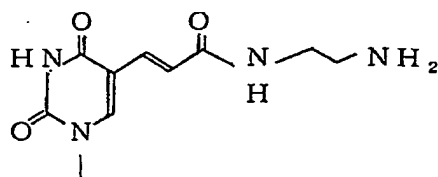
RNA₆ 5'-配列表配列番号19-3'（アンチセンス）

RNA₇ 5'-配列表配列番号20-3'（センス）

RNA₈ 5'-配列表配列番号21-3'（アンチセンス）

ただし、X=

【化11】



このようにして得たRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

【0030】

製造例 3

RNA₁の5'末端を製造例1と同様にして化学修飾したのち、末端アミノ基の保護基であるモノメトキシトリチル基(MMT)を3%濃度のトリクロロ酢酸アセトニトリル溶液で1分間処理することにより脱離させた。

次いで、ヘキサメトキシジイソシアネートをアセトニトリルに溶かして調製した0.5モル濃度溶液を加え、20℃で5時間反応させたのち、生成物を分離し、これにジメチルホルムアミド中で各種ポリアミン、糖類又は各種ペプチドのフリーのアミノ基をもつものを連続的に反応させた。

【0031】

次に、反応生成物を常法に従って、濃アンモニア水中、50℃で6時間処理することにより、固相担体からの切り出しと保護基の除去を行ったのち、得られた5'末端コンジュゲートRNAを逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製し、MALDI TOF-MSにより同定した。

このようにして、表1に示す5'-末端にポリアミン、糖類又はペプチドが導入されたRNAが得られた。

このようにして得たRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

センス鎖 5'-配列表配列番号22-3'

ただし、塩基配列中の $n = -O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-R^1$

【0032】

【表1】

RNAの種類	R ¹	R ¹ の塩基配列
RNA ₉	スベルミン	—
RNA ₁₀	スベルミジン	—
RNA ₁₁	トリス(2-アミノエチル)アミン	—
RNA ₁₂	トリエチルテトラミン	—
RNA ₁₃	グルコサミン	—
RNA ₁₄	ガラクトサミン	—
RNA ₁₅	HIV-1 Rev核外移行シグナル	配列表配列番号3
RNA ₁₆	PKI α 核外移行シグナル	配列表配列番号4
RNA ₁₇	MAPKK核外移行シグナル	配列表配列番号5
RNA ₁₈	Dsk-1核外移行シグナル	配列表配列番号6
RNA ₁₉	TFⅢA核外移行シグナル	配列表配列番号7
RNA ₂₀	HIV-1 tat C-Terminus膜融合ペプチド	配列表配列番号8
RNA ₂₁	gp-41膜融合ペプチド	配列表配列番号9
RNA ₂₂	SV40 T antigen核局在化シグナル	配列表配列番号10
RNA ₂₃	HIV-1 tat 核局在化シグナル	配列表配列番号11
RNA ₂₄	両親媒性人工デザインペプチド α -ヘリックス	配列表配列番号12
RNA ₂₅	両親媒性人工デザインペプチド β -シート	配列表配列番号13
RNA ₂₆	両親媒性人工デザインペプチド β -シート	配列表配列番号14
RNA ₂₇	両親媒性人工デザインペプチド β -シート	配列表配列番号15

【0033】

製造例4

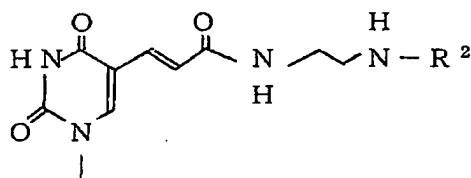
製造例2と同様にして、非末端位置に化学修飾塩基Xを含むセンス鎖を製造し、アミノ化試薬の保護基であるトリフルオロアセチル基をエチレングリコールの20%濃度アセトニトリル溶液で1分間処理することによって脱離させた。次いで、製造例3と同様にして、まずヘキサメチレンジイソシアネートをアセトニトリル溶液として反応させ、さらに各種ポリアミンをジメチルホルムアミド溶液として反応させたのち、製造例3と同様に処理することによって、表2に示されるような非末端位置に化学修飾塩基YをもつRNAを得た。

このようにして得たRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

センス鎖=5'-配列表配列番号23-3'

Y=

【化12】



【0034】

【表2】

RNAの種類	R ²
RNA ₂₈	スペルミン
RNA ₂₉	スペルミジン
RNA ₃₀	グルコサミン
RNA ₃₁	ガラクトサミン

【0035】

これらのセンス鎖と製造例3で得た非末端位置に化学修飾塩基Yをもつアンチセンス鎖とを用いて、コンジュゲートsiRNAを製造した。このようにして得られたコンジュゲートsiRNAはMALDI TOF-MSによって同定された。

【0036】

製造例5

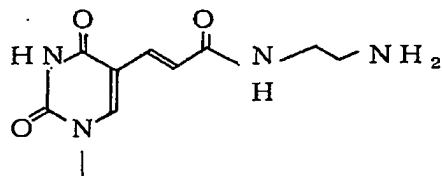
製造例3及び製造例4とを組み合わせることによりRNA₁の5'末端をnで化学修飾し、かつ塩基配列の非末端位置にあるtをXによって置換することにより、表3に示すRNAを製造した。このようにして得たコンジュゲートRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

センス鎖=5'-配列表配列番号24-3'

ただし、塩基配列中のn=-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-R¹

X=

【化13】



【0037】

【表3】

RNAの種類	R ¹	R ¹ の塩基配列
RNA ₃₂	スベルミン	—
RNA ₃₃	スベルミジン	—
RNA ₃₄	グルコサミン	—
RNA ₃₅	ガラクトサミン	—
RNA ₃₆	HIV-1 Rev核外移行シグナル	配列表配列番号3
RNA ₃₇	PKI α 核外移行シグナル	配列表配列番号4
RNA ₃₈	MAPKK核外移行シグナル	配列表配列番号5
RNA ₃₉	Dsk-1核外移行シグナル	配列表配列番号6
RNA ₄₀	HIV-1 tat C-Terminus膜融合ペプチド	配列表配列番号8
RNA ₄₁	gp-41膜融合ペプチド	配列表配列番号9
RNA ₄₂	SV40 T antigen核局在化シグナル	配列表配列番号10
RNA ₄₃	両親媒性人工デザインペプチド α -ヘリックス	配列表配列番号12
RNA ₄₄	両親媒性人工デザインペプチド β -シート	配列表配列番号14

【0038】

製造例6

製造例5と同様にしてRNA₁の5'-末端をnで化学修飾し、かつ塩基配列の非末端位置にある複数のu又はtをXによって置換することにより、表4に示すRNAを製造した。このようにして得たコンジュゲートRNAのMALDI TOF-MSを表5に示す。

【0039】

【表4】

センス鎖	配列表配列番号25
5'末端のn	-O-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ CH ₂ NH-R ¹
X	化13
RNA ₄₅	R ¹ =HIV-1 Rev核外移行シグナル 塩基配列: 配列表配列番号3
RNA ₄₆	R ¹ =PKI α 核外移行シグナル 塩基配列: 配列表配列番号4
RNA ₄₇	R ¹ =MAPKK核外移行シグナル 塩基配列: 配列表配列番号5

【0040】

【表 5】

RNAの種類	Ms(計算値)	MALDI TOF-MS
RNA ₃	6739.11	6740.34
RNA ₄	6910.15	6911.72
RNA ₅	6670.13	6672.21
RNA ₆	6742.10	6740.68
RNA ₇	6768.17	6766.96
RNA ₈	7036.24	7037.33
RNA ₉	7110.56	7115.64
RNA ₁₀	7053.42	7058.35
RNA ₁₁	7054.45	7056.04
RNA ₁₂	7054.46	7059.68
RNA ₁₃	7088.87	7070.43
RNA ₁₄	7088.87	7078.43
RNA ₁₅	8187.79	8190.78
RNA ₁₆	8290.96	8294.23
RNA ₁₇	8694.27	8690.33
RNA ₁₈	8512.01	8514.80
RNA ₁₉	9185.87	9186.01
RNA ₂₀	8593.04	8595.87
RNA ₂₁	8528.13	8534.35
RNA ₂₂	8019.64	8032.56
RNA ₂₃	8912.59	8910.92
RNA ₂₄	8515.27	8516.70
RNA ₂₅	8501.25	8503.23
RNA ₂₆	9039.95	9041.20
RNA ₂₇	8843.85	8847.54
RNA ₂₈	6899.47	6900.08
RNA ₂₉	6842.33	6845.43
RNA ₃₀	6876.78	6877.03
RNA ₃₁	6876.78	6877.55
RNA ₃₂	7208.61	7212.33
RNA ₃₃	7151.47	7153.67
RNA ₃₄	7186.92	7169.98
RNA ₃₅	7186.92	7172.32
RNA ₃₆	8285.84	8288.55
RNA ₃₇	8389.01	8390.76
RNA ₃₈	8792.31	8793.22
RNA ₃₉	8610.05	8612.01
RNA ₄₀	8691.09	8690.44
RNA ₄₁	8626.18	8629.23
RNA ₄₂	8117.69	8118.02
RNA ₄₃	8613.32	8620.46
RNA ₄₄	9138.00	9135.67
RNA ₄₅	8579.99	8580.85
RNA ₄₆	8683.16	8688.04
RNA ₄₇	9086.46	9090.11

【0041】

実施例 1~14

センス鎖として、RNA₉、RNA₁₅～RNA₂₇を、アンチセンス鎖としてRNA₂を用いてコンジュゲート型 siRNA を形成させた。

このようにして得たコンジュゲート型 siRNA の1 μ M を、ウシ胎児血清 (FBS) を10質量%含むRPMI培地中に添加し、37℃においてインキュベートしたのち、2時間、4時間、6時間、12時間及び24時間経過後のコンジュゲート siRNA の分解率を測定した。この測定は、20質量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により siRNA を分離し、銀染色法を用いて検出することにより行った。この結果を表6に示す。

なお、対照として化学修飾塩基を導入しないセンス鎖RNA₁及び化学修飾塩基を導入しないアンチセンス鎖RNA₂を用いて形成させた siRNA についての分解率も併記した。

【0042】

【表6】

実施例	siRNA (センス/アンチセンス)	siRNAの分解率(%)				
		2時間後	4時間後	6時間後	12時間後	24時間後
対照	RNA ₁ /RNA ₂	65.2	82.0	100	100	100
1	RNA ₉ /RNA ₂	47.1	62.6	76.7	87.7	100
2	RNA ₁₅ /RNA ₂	6.6	20.9	27.9	36.5	45.2
3	RNA ₁₆ /RNA ₂	8.0	13.7	21.6	26.8	35.2
4	RNA ₁₇ /RNA ₂	7.8	26.8	37.6	39.8	53.8
5	RNA ₁₈ /RNA ₂	2.6	16.1	21.6	26.8	41.7
6	RNA ₁₉ /RNA ₂	12.7	24.0	32.0	42.6	48.4
7	RNA ₂₀ /RNA ₂	9.3	19.1	22.9	27.3	33.4
8	RNA ₂₁ /RNA ₂	5.1	17.5	31.7	32.7	36.8
9	RNA ₂₂ /RNA ₂	3.6	9.3	15.6	20.1	28.9
10	RNA ₂₃ /RNA ₂	5.8	11.4	14.1	20.3	25.9
11	RNA ₂₄ /RNA ₂	7.9	14.7	19.4	28.4	35.9
12	RNA ₂₅ /RNA ₂	6.0	11.7	15.6	18.9	24.1
13	RNA ₂₆ /RNA ₂	1.6	5.7	9.8	14.7	17.4
14	RNA ₂₇ /RNA ₂	4.4	10.7	14.1	16.1	17.8

【0043】

この表から分るように、5'末端に化学修飾塩基を導入したセンス鎖と、また5'末端に化学修飾塩基を導入したアンチセンス鎖を用いた siRNA については、スベルミンコンジュゲート (RNA₉) のセンス鎖を用いた場合は、酵素に対する耐性が低い、それ以外の場合は、明らかにかなりの耐性の向上を示した。特に7個のLeuArg又はLeuLysをコンジュゲートしたセンス鎖を用いたもの (RNA₂₆又はRNA₂₇) は、高い耐性を示した。

【0044】

実施例15～19

実施例1～14と同様にして、非末端に化学修飾塩基を有するセンス鎖と化学修飾塩基を有しないアンチセンス鎖から siRNA を形成させ、その酵素による分解率を測定した。その結果を表7に示す。

【0045】

【表7】

実施例	siRNA (センス/アンチセンス)	siRNAの分解率(%)				
		2時間後	4時間後	6時間後	12時間後	24時間後
15	RNA ₅ /RNA ₂	36.2	71.3	81.3	94.5	100
16	RNA ₂₈ /RNA ₂	19.9	30.5	40.7	45.7	53.3
17	RNA ₂₉ /RNA ₂	12.9	19.5	25.7	37.7	42.9
18	RNA ₃₀ /RNA ₂	7.8	16.5	22.2	37.7	40.0
19	RNA ₃₁ /RNA ₂	11.9	27.8	37.6	42.9	48.7

【0046】

非末端に化学修飾塩基を有するセンス鎖と化学修飾塩基を有しないアンチセンス鎖から形成されたsiRNAのほとんどは、24時間経過しても、その分解率は50%以下である。

【0047】

実施例20～32

実施例1～14と同様にして、5'末端と非末端に化学修飾塩基を同時に導入したセンス鎖と化学修飾塩基を有しないアンチセンス鎖からsiRNAを形成させ、その酵素による分解率を測定した。その結果を表8に示す。

【0048】

【表8】

実施例	siRNA (センス/アンチセンス)	siRNAの分解率(%)				
		2時間後	4時間後	6時間後	12時間後	24時間後
20	RNA ₃₂ /RNA ₂	25.1	38.8	43.7	52.0	62.0
21	RNA ₃₆ /RNA ₂	11.7	14.6	19.0	23.2	28.2
22	RNA ₃₇ /RNA ₂	5.9	12.0	15.8	18.6	23.8
23	RNA ₃₈ /RNA ₂	8.3	17.5	23.2	30.6	39.6
24	RNA ₃₉ /RNA ₂	3.6	9.1	13.8	16.1	24.7
25	RNA ₄₀ /RNA ₂	13.1	14.7	28.5	33.6	43.9
26	RNA ₄₁ /RNA ₂	16.9	21.0	24.8	32.3	43.3
27	RNA ₄₂ /RNA ₂	3.0	6.5	8.8	13.3	22.9
28	RNA ₄₃ /RNA ₂	1.5	12.0	13.7	15.9	20.5
29	RNA ₄₄ /RNA ₂	0.9	7.4	9.3	12.7	14.4
30	RNA ₄₅ /RNA ₂	0	2.4	2.8	4.4	5.4
31	RNA ₄₆ /RNA ₂	0	0.7	2.4	3.7	5.1
32	RNA ₄₇ /RNA ₂	0.7	2.1	2.8	4.0	4.8

【0049】

この表から明らかなように、5'末端と非末端に化学修飾塩基を同時に導入したセンス鎖を用いたsiRNAについては、PKI α 核外移行シグナルペプチド(RNA₃₇)、Dsk-1核外移行シグナルペプチド(RNA₃₉)、SV40 T 抗原核局在化シグナルペプチド(RNA₄₂)、人工ペプチド(RNA₄₃)、人工ペプチド(RNA₄₄)をコンジュゲートした場合は、特に高い酵素分解耐性を示す。

【0050】

また、5'末端、複数の非末端が同時にコンジュゲートされたsiRNAについては、HIV-1 Rev核外移行シグナルペプチド(RNA₄₅)、PKI α 核外移行シグナルペプチド(RNA₄₆)及びMAPKK核外移行シグナルペプチド(RNA₄₇)をコンジュゲートしたものは、いずれも分解率5%以下という高い耐性を示す。

【0051】

参考例 1

実施例 1~32 で得た siRNA 100 μ M に、白血病細胞 (Jurkat: 0.5×10^6 cells/ml) を加え、10 質量% の FBS を含む RPMI 培地中、5 体積% CO_2 を含む雰囲気中において、37℃ で 48 時間インキュベートしたのち、細胞毒性をセル・バイアビリティ・キット (プロメガ社製) を用いて測定した。

その結果、実施例 21 及び実施例 26 で得た siRNA については、48 時間後の細胞生存率が 90% とわずかな毒性が認められたが、それ以外のものについては、ほとんど毒性は認められなかった。

【0052】

参考例 2

蛍光ラベル化したコンジュゲート siRNA (1 μ M) を白血病細胞 (Jurkat: 1×10^6 cells/ml) へ加え、10% FBS を含む RPMI 培地中、5% CO_2 存在下、37℃ で 48 時間インキュベートした。その後、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で細胞導入性及び細胞内局在化を観察した。

その結果、センス鎖 5' - 末端に各種ペプチドをコンジュゲートした実施例 2、実施例 3、実施例 4、実施例 5、実施例 9、実施例 10、実施例 11、実施例 13 で得た siRNA のすべてにおいて細胞への取り込みが著しく促進された (共焦点レーザー励起蛍光顕微鏡の観察による)。

また、核外移行シグナルペプチドをコンジュゲートした実施例 2、実施例 3、実施例 4、実施例 5 で得た siRNA と人工ペプチドをコンジュゲートした実施例 11 で得た siRNA は細胞質に、核外移行シグナルペプチドをコンジュゲートした実施例 9、実施例 10 と人工ペプチドをコンジュゲートした実施例 13 で得た siRNA は核内にそれぞれ局在化していることが分った。

【0053】

コンジュゲート siRNA (100 nM) を白血病細胞 (K-562: 1×10^6 cells/ml) へ添加し、10% FBS を含む RPMI 培地中、5% CO_2 存在下、37℃ で 48 時間インキュベートした。次いで、プロテイン・チロシンキナーゼ・アッセイ法によりチロシンキナーゼ阻害活性を測定し、百分率で表わした。

その結果、天然型 siRNA ($\text{RNA}_1/\text{RNA}_2$) においては、6% の阻害効果しか認められなかったのに対して、コンジュゲート siRNA では 90% 以上という高い阻害効果が見られた。特に、センス鎖 5' - 末端と 3' - 末端近傍を同時に HIV-1 Rev 核外移行シグナルペプチドでコンジュゲートした実施例 21 で得た siRNA ($\text{RNA}_{36}/\text{RNA}_2$) ではほぼ 100% の阻害効果を達成した。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明によれば、遺伝子医薬の効力を向上させることができるので、医薬分野においての利用性が高い。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology;
Kinki University;Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry
Science and Technology

<120>Novel Conjugate type siRNA

<130>2004002581

<160>25

<210>1

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Probe

<400>1

cuacaucacg ccagucaact t 21

<210>2

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Probe

<400>2

guugacuggc gugauguagt t 21

<210>3

<211>9

<212>PRT

<213>HIV-1 Rev

<400>3

Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1

5

<210>4

<211>10

<212>PRT

<213>PKI α

<400>4

Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp Ile
1 5 10

<210>5
<211>13
<212>PRT
<213>MAPKK

<400>5
Ala Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu
1 5 10

<210>6
<211>13
<212>PRT
<213>Dsk-1

<400>6
Ser Leu Glu Gly Ala Val Ser Glu Ile Ser Leu Arg Asp
1 5 10

<210>7
<211>19
<212>PRT
<213>TFIIIA

<400>7
Gln Pro Asp Ala Ser Lys Ala Asp Pro Leu Pro Val Leu Glu Asn Leu Thr Leu Lys
1 5 10 15

<210>8
<211>14
<212>PRT
<213>HIV-1 tat C-terminus

<400>8
Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly Pro Lys Glu
1 5 10

<210>9
<211>16
<212>PRT
<213>gp-41

<400>9
Ala Val Gly Ala Ile Gly Ala Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

<210>10
<211>7

<212>PRT
<213>SV40 T antigen

<400>10
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210>11
<211>14
<212>PRT
<213>HIV-1 tat

<400>11
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly
1 5 10

<210>12
<211>12
<212>PRT
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Peptide

<400>12
Leu Arg Ala Leu Leu Arg Ala Leu Leu Arg Ala Leu
1 5 10

<210>13
<211>10
<212>PRT
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Peptide

<400>13
Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg
1 5 10

<210>14
<211>14
<212>PRT
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Peptide

<400>14
Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg

1

5

10

<210>15

<211>14

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Peptide

<400>15

Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys

1

5

10

<210>16

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified_base

<222>(1)..(1)

<223>Linker

<400>16

ncuacaucac gccagucaac tt 22

<210>17

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified_base

<222>(1)..(1)

<223>Linker

<400>17

nguugacugg cgugauguag tt 22

<210>18

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified_base

<222>(20)..(20)

<223>Modified thymidine

<400>18
cuacaucaag ccagucaact t 21

<210>19
<211>21
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(20)..(20)
<223>Modified thymidine

<400>19
guugacuggc gugauguagt t 21

<210>20
<211>21
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(6)..(6)
<223>Modified thymidine

<220>
<221>modified_base
<222>(15)..(15)
<223>Modified thymidine

<400>20
cuacaucaag ccagucaact t 21

<210>21
<211>21
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(7)..(7)
<223>Modified thymidine

<220>
<221>modified_base
<222>(12)..(12)
<223>Modified thymidine

<220>

<221>modified_base
<222>(15)..(15)
<223>Modified thymidine

<220>
<221>modified_base
<222>(17)..(17)
<223>Modified thymidine

<400>21
guugacuggc gugauguagt t 21

<210>22
<211>22
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(1)..(1)
<223>Linker

<400>22
ncuacaucac gccagucaac tt 22

<210>23
<211>21
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(20)..(20)
<223>Modified thymidine

<400>23
cuacaucacg ccagucaact t 21

<210>24
<211>22
<212>RNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<221>modified_base
<222>(1)..(1)
<223>Linker

<220>
<221>modified_base

<222>(21)..(21)

<223>Modified thymidine

<400>24

ncuacaucac gccagucaac tt 22

<210>25

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified_base

<222>(1)..(1)

<223>Linker

<220>

<221>modified_base

<222>(3)..(3)

<223>Modified thymidine

<220>

<221>modified_base

<222>(7)..(7)

<223>Modified thymidine

<220>

<221>modified_base

<222>(16)..(16)

<223>Modified thymidine

<220>

<221>modified_base

<222>(21)..(21)

<223>Modified thymidine

<400>25

ncuacaucac gccagucaac tt 22

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵素耐性を高め、細胞中において酵素により分解されず、また細胞質内に局在化して高い活性を示し、遺伝子医薬として好適に利用し得る新規な siRNA を提供する。

【解決手段】 2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリングエンド或はその両方に化学修飾塩基が導入されているか、センス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方が、非末端位置において化学修飾塩基を含むか、2本鎖を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方における5'末端又はアンチセンス鎖のダングリングエンド或はその両方に、二官能性リンカーを介して、核外移行シグナルペプチド又は膜融合ペプチドを導入したものであるか、センス鎖及びアンチセンス鎖の少なくとも一方が、非末端位置において、二官能性リンカーを介して、核外移行シグナルペプチド又は膜融合ペプチドを導入したものである。

【選択図】 なし

特願 2004-136228

出願人履歴情報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

特願2004-136228

出願人履歴情報

識別番号

[000125347]

1. 変更年月日
[変更理由]

1990年 8月 8日

新規登録

住所
氏名

大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号
学校法人近畿大学

特願 2004-136228

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[802000031]

1. 変更年月日

2002年 4月19日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号

氏 名

財団法人北九州産業学術推進機構